

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-503477

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)4月21日

(51)Int.Cl.  
C 12 P 21/00

識別記号 庁内整理番号  
Z 8214-4B

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 9 頁)

(21)出願番号 特願平5-507150  
(86) (22)出願日 平成4年(1992)10月7日  
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)6月11日  
(86)国際出願番号 PCT/US92/08518  
(87)国際公開番号 WO93/07287  
(87)国際公開日 平成5年(1993)4月15日  
(31)優先権主張番号 775, 136  
(32)優先日 1991年10月11日  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, SE), AU, JP

(71)出願人 プロメガ・コーポレーション  
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53711,  
マディソン, ウッズ・ホール・ロード  
2800  
(72)発明者 トンプソン, デーヴィッド・ブイ  
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53716,  
モノナ, ウエスト・ディーン・アベニュー  
611  
(72)発明者 ヴァン・オースブリー, トーマス・アール  
アメリカ合衆国ウィスコンシン州53705,  
マディソン, コモンウェルス 2123  
(74)代理人 弁理士 湯浅 茂三 (外5名)

(54)【発明の名称】 真核無細胞抽出物中での転写と翻訳の共役

(57)【要約】

真核無細胞抽出物からなる溶液を使用して、マグネシウム濃度をRNAがDNAから転写されそしてRNAがタンパク質に翻訳される値に高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記抽出物に添加することからなるDNAから転写と翻訳を共役させる方法。

## 特表平6-503477 (2)

- 請求の範囲
- RNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳される水準にマグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を真核無細胞抽出物に加えることからなる上記抽出物中でDNAからの転写と翻訳を共役させる方法。
  - 上記抽出物がウサギ膀胱球血球溶解物である請求項1に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約2.5mMから約3.5mMである請求項2に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約2.6mMから約3.0mMである請求項2に記載の方法。
  - ボリアミンが上記溶解物に添加される請求項2に記載の方法。
  - 上記ボリアミンがスペルミジンである請求項5に記載の方法。
  - 上記スペルミジンを上記溶解物に加えて約0.2mMから約0.4mMの濃度にする請求項6に記載の方法。
  - 上記溶解物のカリウム濃度を約40mMから約100mMに調整する請求項2に記載の方法。
  - 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターを上記溶解物に添加することを含む請求項2に記載の方法。
  - 上記リボヌクレアーゼインヒビターがRNasinである請求項9に記載の方法。
    - 転写と翻訳の共役に必要な追加成分を上記溶解物に添加することを含む請求項2に記載の方法。
    - 上記追加成分の1つがRNAポリメラーゼからなる請求項11に記載の方法。
    - 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される請求項12に記載の方法。
    - DNA錠型が上記溶解物に添加される請求項2に記載の方法。
    - 上記DNA錠型が複数のクローニング領域を有する請求項14に記載の方法。
  - 上記リボヌクレアーゼインヒビターがRNasinである請求項29に記載の方法。
    - 転写と翻訳の共役に必要な追加成分が上記溶解物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。
    - 上記追加成分の1つがRNAポリメラーゼからなる請求項31に記載の方法。
    - 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される請求項32に記載の方法。
    - DNA錠型が上記抽出物に添加される請求項22に記載の方法。
    - 上記DNA錠型が複数のクローニング領域を有する請求項34に記載の方法。
    - ポリメラーゼプロモーター配列が上記複数のクローニング領域の一方の末端に位置している請求項35に記載の方法。
    - 上記複数のクローニング領域へのクローニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端に位置する配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるよう、上記錠型が上記複数のクローニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項36に記載の方法。
    - 上記プロモーター配列に対応しているポリメラーゼが上記抽出物に添加される請求項36に記載の方法。
    - 上記DNA錠型が、ポリメラーゼ触媒反応として知られる方法によって製造された超コイル分子、共有的閉環状分子、線状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項34に記載の方法。
    - DNAからRNAの翻訳を可能にするのに十分な量のリボヌクレオチド三リン酸が上記抽出物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。
    - 上記リボヌクレオチド三リン酸が0.4mMのGTP、0.4mMのUTP、0.5mMのCTPおよび1.6mMのATPの値で上記抽出物に添加される請求項40に記載の方法。
    - 請求項1に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。
    - 請求項42に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。
  - 上記複数のクローニング領域へのクローニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端に位置する配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるよう、上記錠型が上記複数のクローニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項16に記載の方法。
  - 上記複数のクローニング領域へのクローニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端に位置する配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるよう、上記錠型が上記複数のクローニング領域の反対側末端にポリA配列を有する請求項16に記載の方法。
  - 上記プロモーター配列に対応しているポリメラーゼが上記溶解物に添加される請求項16に記載の方法。
  - 上記DNA錠型が、ポリメラーゼ触媒反応として知られる方法によって製造された超コイル分子、共有的閉環状分子、線状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項14に記載の方法。
  - DNAからRNAの翻訳を可能にするのに十分な量のリボヌクレオチド三リン酸が上記溶解物に添加されることを含む請求項2に記載の方法。
  - 上記リボヌクレオチド三リン酸が各々0.4mM添加される請求項20に記載の方法。
  - 上記抽出物が小麦胚芽抽出物である請求項1に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約3.0mMから約5.25mMである請求項22に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約4.0mMから約4.75mMである請求項22に記載の方法。
  - ボリアミンが上記抽出物に添加される請求項22に記載の方法。
  - 上記ボリアミンがスペルミジンである請求項25に記載の方法。
  - 上記スペルミジンを上記抽出物に添加して約0.2mMから0.9mMの濃度にする請求項26に記載の方法。
  - 上記抽出物のカリウム濃度が約50mMから約150mMに調整される請求項22に記載の方法。
  - 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターが上記溶解物に添加されることを含む請求項22に記載の方法。
  - 請求項5または請求項23に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。
  - 請求項44に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。
  - 請求項12または請求項32に従って調製された、修正された真核無細胞抽出物。
  - 請求項46に記載の抽出物を含有する容器からなるキット。
  - 特定のポリメラーゼプロモーター配列を有するDNA錠型から溶液中で転写と翻訳の共役によってタンパク質を製造する方法であって、該方法は真核無細胞抽出物の標準的な調製物の溶液を調製し、転写と翻訳を支えるのに十分な濃度のリボヌクレオチド三リン酸、アミノ酸および上記錠型DNAの上記プロモーターに対応しているポリメラーゼ上で上記抽出物溶液を修正し、そしてRNAが上記DNA錠型から転写され且つ該RNAがタンパク質に翻訳される水準に最終マグネシウム濃度を上昇させるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記抽出物溶液に添加することからなる方法。
  - 上記抽出物溶液混合物中のマグネシウムの最終濃度が約0.5mM以上させられる請求項48に記載の方法。
  - 上記抽出物がウサギ膀胱球血球溶解物である請求項48に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約2.5mMから約3.5mMである請求項50に記載の方法。
  - 上記最終マグネシウム濃度が約2.6mMから約3.0mMである請求項50に記載の方法。
  - ボリアミンが上記溶液に添加される請求項50に記載の方法。
  - 上記ボリアミンがスペルミジンである請求項53に記載の方法。
  - 上記スペルミジンを上記溶液に添加して約0.2mMから約0.4mMの濃度にする請求項54に記載の方法。
  - 上記溶液のカリウム濃度が約40mMから約100mMに調整される請求項50に記載の方法。
  - 内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するのに十分な量のリボヌクレアーゼインヒビターが上記溶液に添加されることを含む請求項50に記載の方法。

### 特表平6-503477 (3)

- 方法。
- 5.8. 上記リボヌクレアーゼインヒビターがRNasinである請求項5.7に記載の方法。
- 5.9. 転写と翻訳の共役に必要な追加成分が上記溶液に添加されることを含む請求項5.0に記載の方法。
- 6.0. 上記追加成分の1つがRNAポリメラーゼを含む請求項5.9に記載の方法。
- 6.1. 上記ポリメラーゼがSP6、T7およびT3 RNAポリメラーゼからなる群から選択される請求項6.0に記載の方法。
- 6.2. 上記DNA酵型が、ポリメラーゼ触反応として知られる方法によって製造された環コイル分子、共有的閉環状分子、線状分子またはDNA断片からなる群から選択される形態である請求項5.0に記載の方法。
- 6.3. 上記DNA酵型が複数のクローニング領域を有する請求項6.0に記載の方法。
- 6.4. ポリメラーゼプロモーター配列が上記複数のクローニング領域の1方に末端に位置している請求項6.3に記載の方法。
- 6.5. 上記複数のクローニング領域へのクローニングによってRNAポリメラーゼプロモーターが5'末端にそしてポリア配列が3'末端に位置する遺伝子が生じるように、上記酵型が上記複数のクローニング領域の反対側末端にポリア配列を有する請求項6.4に記載の方法。
- 6.6. 上記溶液に上記リボヌクレオチド三リン酸が各々0.4mM添加される請求項5.0に記載の方法。
- 6.7. 上記抽出物が小麦胚芽抽出物である請求項4.8に記載の方法。
- 6.8. 上記最終マグネシウム濃度が約3.0mMから約5.25mMである請求項6.7に記載の方法。
- 6.9. 上記最終マグネシウム濃度が約4.0mMから約4.75mMである請求項6.8に記載の方法。
- 7.0. ポリアミンが上記溶液に添加される請求項6.7に記載の方法。
- 7.1. 上記ポリアミンがスペルミジンである請求項7.0に記載の方法。

### 明細書

#### 真核無細胞抽出物中の転写と翻訳の共役

##### 発明の背景

本発明は一般に分子生物学に関して、そして更に詳細には真核細胞溶出物または他の抽出物中で酵型DNAからRNAの転写と該RNAの翻訳を共役させることができる新規方法に関するものである。

細胞中の遺伝子の転写と翻訳(発現)に係わる段階は非常に複雑でありそして未だ完全には理解されていない。しかし乍ら、タンパク質はDNAから製造するためには従わなければならぬ基本的なパターンがある。DNAは最初にRNAに転写され、次いでそのRNAが種々の細胞成分の相互作用によってタンパク質に翻訳される。原核細胞(細菌)では転写と翻訳は「共役しており(coupled)」。これはRNAがDNAから転写されている時間中にRNAがタンパク質に翻訳されることを意味する。真核細胞(動物、植物)では、この2つの作用は別個であり、全体の過程ははるかにより一層複雑化されている。DNAは細胞の核内部でRNAに転写されるが、RNAは更にmRNAにプロセッシングされ、そして次いでmRNAはタンパク質に翻訳される核外の細胞質に輸送される。

分子生物学者が遺伝子を単離しクローン化できそして細胞から特定のmRNAまたは「メッセージ」を単離できるので、これらの遺伝子またはメッセージを発現させるために使用し得る系が必要となった。遺伝子の表現は遺伝子の構造と調節を全般的に理解するために重要である。タンパク質を迅速に発現させる方法が現在利用でき、これは遺伝子を操作し次いでその構造に与える操作の影響の研究を可能にしている。遺生すべきタンパク質の量、遺伝子が原核生物であるのかまたは真核生物であるのか、およびインビトロ系またはインビオ系の相対的な利点は、発現系を選択するときに研究者が考慮するファクターの幾つかである。系の選択は研究される遺伝子によって影響される。殆どの場合、原核生物遺伝子は原核生物系で最も良く発現され、そして真核生物遺伝子は真核生物系で一層効率良く且つ正確に発現される。これは、多くの酵素配列およびプロモーターは類似す

る系で一層効率よく認識されるためである。遺伝子の表現はインビオおよびインビトロ系の両方で達成することができる。

原核または真核細胞を使用するインビオ転写系は利用可能であるが、これらの系は細菌の細胞が使用されるので操作が困難である。他方、インビトロ系はDNAまたはRNAをタンパク質に翻訳するために必要な成分を全て含むる原核または真核細胞から製造された無細胞抽出物から製造される。無細胞抽出物は大腸菌(E. coli)のような原核細胞並びにウサギ卵黄赤血球および小麦胚芽のような真核細胞から調製することができる。無細胞系は、それらの調製に利用できる標準的なプロトコールが存在しして多数の供給源から市販で入手できるので、非常に一般的である。

大腸菌S30無細胞抽出物はズベイ(Zubay), G. によって最初に記載された(1973, Ann. Rev. Genet., 7卷, 267頁)。これらの抽出物は発現されるべき遺伝子が適当な原核生物酵母配列、例えばプロモーターやリボソーム結合部位を有するベクター中にクローニングされたときに使用することができる。原核生物大腸菌無細胞系は、抽出物へのDNAの添加後に転写と翻訳が同時に生起するので、「共役している」と考えられる。大腸菌抽出物中で酵型としてRNAを使用するとタンパク質が生成するが、このような反応は共役ではない。ウサギ卵黄赤血球溶解物と小麦胚芽抽出物は好みしくは、原核生物遺伝子またはmRNAの発現に使用される。両者共、真核生物系は既に述べたように共役していないので、タンパク質翻訳の酵型としてRNAを使用することが必要である。

ウサギ卵黄赤血球溶解物はペルハム(Pelham), B. E. B. およびジャクソン(Jackson), R. J. によって記載された(1976, Eur. J. Biochem., 131卷, 285頁)。この発現系は多分インビトロ翻訳に最も広範に使用されている無細胞系であり、そしてmRNA種の同定、それらの発生物の特異決定、転写と翻訳の制御の研究に使用される。シグナルペプチド開裂およびコア-グリコシル化のようなプロセッシングはイヌのミクロゾーム膜を標的的な翻訳反応に加えることによって試験される(Walter, P. および Blobel, G. (1983) Meth. Enzymol., 96, 50)。ウサギ卵黄赤血球溶解物はまた、アセチル化、イソブレニル化、タンパク質分離および成る種のリン酸化活性を含む種々の転写後プロセッシング活性も有している(Gla-

ss.C.A. Pollard, E.W. (1990) Promega Nature, 26).

小麦胚芽抽出物はロバーツ (Roberts), B.C. およびパーソン (Paterson), B.E. によって記載された (1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70巻, 2330頁), 小麦胚芽の真核細胞溶出物は多種のウイルスおよび他の原核生物のRNA並びに真核生物のmRNAのインビトロでの翻訳を示している。(Anderson, C. 等 (1983) Meth. Enzymol. 101, 635)。一般に、小麦胚芽抽出物にはリボヌクレアーゼ活性が存在しているので、小麦胚芽翻訳系の反応混合物中にリボヌクレアーゼインヒビターを含んでいることが必要と見られている。

翻訳研究用のRNAはmRNAを単離するかまたはRNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターにクローニングされているDNAからインビトロでRNA転写物を製造するかのいずれかによって得られる。第1の方法は細胞から直接mRNAまたは「メッセージ」を単離する。

第2の方法はインビトロ転写によってインビトロ翻訳用のRNAを得る。ファージポリメラーゼプロモーターの後にクローニングされたDNAのインビトロ転写はクリーク (Krieg), P. およびメルトン (Melson), D. によって記載された (1984, Nucl. Acids Res., 12巻, 7057頁)。これはインビトロ翻訳反応に使用するためにクローニングした遺伝子からRNAを得る簡単な方法となった。この方法は問題のDNAまたは遺伝子が次のRNAポリメラーゼ、即ちSP6, T7またはT3のうちの1つのプロモーターを有するベクター中にクローニングされることが必要である。次いで、このベクターはクローニングされた遺伝子の3'末端で制限酵素を使用して線状化され、次いでインビトロ転写反応によってRNA転写を行う。SP6, T7およびT3 RNAポリメラーゼプロモーターを有する多数のベクターは市販で入手可能でありそしてDNAのクローニングに広範に使用されている。

いずれにしても、ウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽系に使用されるRNA転写物を得るプロセスは翻訳反応の効率に影響を与える要素を導入する。RNAはリボヌクレアーゼで容易に分解されるので、RNAを用いて操作するときには常に特別の注意を払わなければならない。DNA錠型ははるかにより安定である。

さなければならない。このタイプの系はRNA錠型を導入すると大鼠癌S30錠出物および小麦胚芽抽出物で良好に作用する。スピリン (Spirin) 等 (1988, Science, 242巻, 1162~1164参照)、このシステムはまたウサギ網状赤血球溶解物でRNA錠型を使用しても作用する。リヤボバ (Ryabova) 等 (1989), Nucl. Acid Res., 17巻, 11号, 4412参照。この系はまた大鼠癌S30錠出物中でDNA錠型を使用しても良好に作用することが知られている。バラノフ (Baranov) 等 (1988), Gene, 84巻, 483~466参照。PCT公開WO9102076は真核生物溶解物を使用するDNA錠型からの連続的な真核細胞翻訳を示している。

連続反応は10時間から約100時間まで複数回に実施され、そして組み立て直し実施するためには時間および供給源のかなりの投資が必要である。「連続」系での翻訳はまた大量のタンパク質を産生させる方向にも向けており、そして標準的な(静置)インビトロ翻訳反応とかなり異なっている。静置反応は少ない反応容量で、典型的にはマイクロリットルで測定される量で行うことができ、そしてそれはしばしば1乃至2時間で完結される。静置翻訳反応は調製量(ミリグラム)のタンパク質を産生する方向には向いていない。静置反応は一般に、研究的用途、例えばmRNA錠の同定、待機決定または転写活性としては翻訳制御の研究用にタンパク質を産生させるために使用される。インビトロ翻訳で現在知られているウサギ網状赤血球系または小麦胚芽系はいずれも、静置反応混合物中で転写と翻訳の共役を提供していない。

#### 発明の要約

それ故、本発明の1つの目的は標準的なインビトロ翻訳反応で真核細胞溶解物を使用して錠型DNAからタンパク質を製造する簡単な方法を提供することである。

本発明の更に特定の目的は、DNA錠型によってコードされる單一のタンパク質の転写と翻訳を共役させるために使用できる上記方法を提供することである。

もう1つの目的は真核細胞溶解物を使用する転写と翻訳の共役反応によって、DNA錠型からインビトロでのタンパク質の産生が高い方法を提供することである。

更にもう1つの目的は、転写と翻訳の共役実験に使用される真核細胞溶解物を

ウサギ網状赤血球溶解物および小麦胚芽抽出物が真核細胞溶解物として開発された後、転写と翻訳を共役させる試みがなされた。開発された1つの系は「連続されている(linked)」転写と翻訳系であった (Roberts, B.E. 等 (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72巻, 1922~1926)。この系は小麦胚芽抽出物を使用することに係るものでありそして大鼠癌のRNAポリメラーゼを使用するSV40ウイルスDNAの転写と翻訳を考慮していた。この系では転写は小麦胚芽抽出物の添加直前の15分のインキュベーション段階で生じる。これらの段階は転写に必要な緩衝液条件と翻訳に必要な緩衝液条件との間の不適合性のために、そして更には両プロセスの温度条件が異なるために分離されている。この系には多くの欠点がある。1つは、多数の異なるタンパク質が同一のSV40DNA錠型から同時に合成されるので、タンパク質産生の度合いが制御されていないことである。この研究の著者は共役系が開発されたことを示しているが、共役系のデータは示されなかった。

もう1つの系はペルハム, H.R.B. 等によって開発され (1978)、Eur. J. Biochem., 82巻, 189~208、その麻疹と翻訳の共役はワクシニアウイルスコア粒子をウサギ網状赤血球溶解物に導入した後に生じた。ウイルスDNAからワクシニアタンパク質の産生は多分内因性ワクシニアRNAポリメラーゼによる転写とそれに続く溶解物による翻訳によるものであった。この系は、ワクシニア以外の供給源の外因性DNAはRNAポリメラーゼによって認識されないので転写または翻訳が生起せず、ワクシニアタンパク質だけが産生されるという事実によって制限された。ウイルスコア粒子は単離しなければならず、そしてこの著者は单一のタンパク質だけを専ら産生させることはできなかった。

タンパク質の大規模産生に重点をおいた「連続的な」無細胞インビトロ翻訳系を使用する研究も記載されている。連続系はより通常のバッチタイプまたは含まれている反応容量で生じる静置インビトロ翻訳反応とは非常に異なっている。連続的翻訳は、大規模反応が組み立てられることでタンパク質が長期間に亘って「連続的に」翻訳されるバイオリアクター (例えばAmicon 80C 隅外ろ過ユニット) に係るものである。この反応には、反応の進行につれて反応中に緩衝液を供給する必要があり、そしてまた翻訳の底生物も反応フィルターユニットから取り出

製造する方法を提供することである。

更に尚もう1つの目的は転写と翻訳の共役反応に必要な1つまたはそれ以上の成分または試薬を育てる上記溶解物調製物を製造することである。

もう1つの目的は転写と翻訳の共役実験に使用される上記調製物を提供することである。

本発明の更にもう1つの目的は調製されたウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を有してDNA錠型から転写と翻訳を共役させる反応混合物を製造するに必要な他の成分若しくは試薬を含有するキットを提供することである。

更に特定の目的は少なくとも1つの成分として、転写と翻訳を共役させるに必要な1つまたはそれ以上の試薬を育てる調製されたウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物調製物を有するキットを提供することである。

上記の目的や他の目的を達成するために、本発明は真核細胞溶解物中で転写と翻訳を共役させる方法を提供する。本方法は、RNAがDNAから転写されそしてRNAがタンパク質に翻訳されるまで溶解物の最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を溶解物に添加することからなる。

本発明はまた、溶液中での転写と翻訳の共役によって、待定のポリメラーゼプロモーター配列を有するDNA錠型からタンパク質を製造する方法も提供する。これは、真核細胞溶解物の標準的な調製物を調製し、転写と翻訳を支えるのに十分な濃度のリボヌクレオチド三リン酸、アミノ酸および錠型DNAのプロモーター配列に対応しているポリメラーゼで溶解物を修正し、そしてRNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳されるまで最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量のマグネシウム化合物を上記溶液に添加することによって達成される。DNAのプロモーター配列に接種する遺伝子に対応するタンパク質だけが製造される。

本発明は更に、RNAがDNAから転写され且つRNAがタンパク質に翻訳されるまで最終マグネシウム濃度を高める方法に従って調製された修正真核細胞溶解物を提供する。この溶解物は調製中にどのように調整されたマグネシウム濃度を育することができる。本発明はまた、転写と翻訳の共役用の真核細胞溶解物を含有する容器からなるキットも提供する。調整されたマグネシウム濃度

を有することに加えて、この溶解物は転写と翻訳の共役に必要な種々の追加成分を含有することができる。含有させることができる追加成分の1つはRNAポリメラーゼである。他のものは種々の技術改変しくは塩または転写と翻訳の共役反応条件を最適にする他の成分若しくは試薬、例えば翻訳の効率を高めることができられているスペルミジンである。

ウサギ網状赤血球または小麦胚芽系での転写と翻訳の共役化は、RNA錠型による標準的なインビトロ翻訳と比較すると、タンパク質産生を顕著に高め、そして共役した転写と翻訳は広範囲の分子量サイズに亘って多様な種々のタンパク質に作用することが示されている。

翻訳される遺伝子またはDNAは好ましくは、SP6、T7若しくはT3プロモーターのようなRNAポリメラーゼプロモーター、またはポリメラーゼが利用可能になる任意のRNAポリメラーゼプロモーターの後でクローン化される。DNA錠型は閉環状プラスミドDNAの形態または線状プラスミドDNAとして転写と翻訳の共役反応に導入される。RNAポリメラーゼプロモーター配列はまた熱衝撃増幅方法によって特定のDNAフラグメントに結合させることができ、そしてこれらの線状DNAフラグメントは転写と翻訳の共役反応に使用することができる。

標準的なインビトロ翻訳反応には時間と資源を投資する必要が殆どなく、そして該反応はタンパク質を定量的に発現させるために良好に確立された方法である。標準的なインビトロ翻訳反応でウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を使用して転写と翻訳を共役させることによって、別個のインビトロ転写反応の必要性がなくなり、そしてタンパク質の産生が顕著に高められる。かくして、ウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物を使用した転写と翻訳の共役は現行の標準的なインビトロ翻訳反応に比べて顕著な改良を提供する。予期されなかつた利益は、所望のタンパク質生成物の産生が標準的なインビトロ翻訳反応にRNAを添加することによって見られる産生に比べて劇的に（数倍）高まることがある。更に、共役した転写と翻訳では別個のキャッピング反応の必要がない。

もう1つの利点は、特定のRNAポリメラーゼプロモーターを含むしクローニングされるかまたは増幅されたDNA錠型からタンパク質を産生できることである。

このようにして、プロモーターの下流の單一の遺伝子からRNAを合成するように指令することができ、そしてこのRNAから翻訳されるタンパク質だけが産生される。このRNAが唯一のタンパク質を指令する場合には、該反応によって唯一のタンパク質が産生される。このように使用されるプラスミドベクターは当該技術分野で廣く知られており、そして幾つかの供給源から入手可能であり、研究者は希望の任意のクローン化遺伝子からタンパク質を産生させることができる。

本発明の他の、微および利点は、以下の詳細な説明および請求の範囲を検討することによって当業者に明白となろう。

#### 好みしい実施態様の説明

本発明の目的のためには、任意の真核細胞溶解物を使用することができ、そしてそれらを製造するためには多数の慣用的技術が存在する。真核細胞真核細胞溶解物は多くの理由により、少なくとも部分的にはそれらが種々の翻訳後プロセシング活性を保持しているので、好みしい実施態様である。イタのミクロゾーム調を添加して、シグナルペプチド開裂およびコアグリコシル化のようなプロセシングを試験することができる。真核細胞溶解物はまた広範囲のウイルスおよび他の原核生物RNA、並びに真核生物mRNAのインビトロでの翻訳を支える。

他の真核生物系も通しているが、ウサギ網状赤血球溶解物および小麦胚芽抽出物が好みしい。これららの真核生物溶解物は研究者に一般的であり、そして広範に入手可能である。好みしい実施態様では、ウサギ網状赤血球溶解物はペルハム、H. L. オンビジャクソン、R. J. によって記載され（1976、Eur. J. Biochem. 67、247-256）そして製造プロトコールL415/L418、プロメガコーポレーション（Promega Corp.）、ウィスコンシン州マディソン、に従って修正された方法によって開発される。網状赤血球溶解物はフェニルヒドラジンを注射したニュージーランドホワイトラビットから調製され、これによって各ロットで信頼性のある一定した網状赤血球の産生が確保される。網状赤血球は、最終抽出物の翻訳特性を変化させる不純細胞を除去するために精製される。網状赤血球を溶解させた後、抽出物はミクロコッカヌクレアーゼおよびCaCl<sub>2</sub>で処理して内因性mRNAを破壊し、そしてその結果バックグラウンド翻訳を減少させて最小にする。次いで、EGTAを加えてCaCl<sub>2</sub>をキレート化させ、それによってヌクレアーゼを不活

性化する。

この溶解物はタンパク質合成に必要な細胞成分を含有している。これらにはtRNA、rRNA、アミノ酸並びに開始、延長および終結因子が含まれる。この溶解物は更に、予め試験したホスホクレアチキンキナーゼおよびホスホクレアチキンからなるエネルギー発生系を添加することによってmRNA翻訳が最適化される。翻訳され得るmRNAの範囲を拡張するためにtRNAの混合物や開始阻害を阻止するためにヘミンも添加される。ヘミンは開始因子eIF2αのインヒビターのサブレッサーであるので、網状赤血球溶解物に加えられる。ヘミンが存在しないと、網状赤血球溶解物中のタンパク質合成は短期間のインキュベーション後に停止する（Jackson, R. および Bunt, T.、1983 Meth. In Enzymol. 96, 50）。酢酸カリウムおよび酢酸マグネシウムは大部分のmRNA種の翻訳に推奨される量で添加する。これがインビトロ翻訳で使用される標準的なウサギ網状赤血球溶解物である。標準的なウサギ網状赤血球溶解物の最終マグネシウム濃度は典型的には約4.2から5.0mMの範囲であり、該溶解物は転写と翻訳の共役反応では50%比率のものが使用される。

#### ウサギ網状赤血球溶解物（50%溶解物）の翻訳反応における

##### 添加成分の最終濃度割合

クレアチニン酸	7mM
クレアチニンホスホキナーゼ	25μg/ml
DTT	1.4mM
ウシ肝臓tRNA	35μg/ml
酢酸カリウム	5mM
酢酸マグネシウム	350μM
ヘミン	14.3μM

もう1つの好みしい実施態様では小麦胚芽抽出物を使用する。これはロバーツ、B. E. およびバターソン、B. M. によって記載されている方法（1973、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70巻、第8号、2330～2334頁）、アンダーソン（Anderson, C. T. 等によって記載されている修正（1983、Meth. Enzymol. 101巻、635頁））に従って、そして製造プロトコールL418、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン、のように修正して製造することができる。一般に、小麦胚芽抽出物は抽出液中で小麦胚芽を粉砕し、次いで遠心して細胞破片を除去することによって調製される。次いで、クロマトグラフィーによって翻訳を粗面する内因性のアミノ酸および植物類科から上清液を分離する。この抽出物もバックグラウンド翻訳を減少させて最小にするため更にミクロコッカヌクレアーゼで処理して内因性mRNAを破壊する。この抽出物はtRNA、rRNA並びに開始、延長および終結因子のようなタンパク質合成に必要な細胞成分を含有している。この抽出物は更に、ホスホクレアチキンキナーゼおよびホスホクレアチキンからなるエネルギー生成系を添加することによって最適化され、そして酢酸マグネシウムは大部分のmRNA種の翻訳に推奨される量で添加する。標準的小麦胚芽抽出物の最終マグネシウム濃度は典型的には約6.0mMから7.5mMの範囲である。

## 特表平6-503477 (6)

小麦胚芽抽出物(50%抽出物)の翻訳反応における  
添加成分の最終濃度割合

クレアチニン酸	10mM
クレアチヌホスホキナーゼ	50μg/ml
DTT	5mM
ウシ肝臓 tRNA	50μg/ml
酵母マグネシウム	3.0~3.75mM
酢酸カリウム	50mM
スペルミジン	0.5mM
ATP	1.2mM
GTP	0.1mM
HEPES (pH 7.6)	12mM

共役した転写と翻訳では、真核細胞溶解物のマグネシウム濃度は添加されるマグネシウム化合物、好みしくは塩によって調整しなければならない。好みしい塩には塩化マグネシウムおよび酢酸マグネシウムがある。緩衝剤を添加する必要はないが、緩衝剤の添加はpHを安定化させるため常液として使用することができる。転写と翻訳を共役させるために、RNAがDNAから転写されをしてRNAがタンパク質に翻訳される直に最終マグネシウム濃度を高めるのに十分な量の塩化または酢酸マグネシウムが溶解物に添加される。この値は使用される溶解物に依存して変化する。

標準的なウサギ網状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物に原核生物のRNAポリメラーゼおよびリボヌクレオチド三リン酸を単に添加しても、インビトロでのDNA複型からのタンパク質産生は可能でない。しかしながら、記載されるようにこの系で塩濃度を特別に調整すると、DNAからRNAへの転写およびRNAからタンパク質への翻訳の両方を可能にする溶解物内での条件がつくれてタンパク質の産生が可能になる。

マグネシウムは集合させたりボソームの安定性およびそれらの翻訳中の結合機能を高めるので、翻訳を最適化するのに重要であることが知られている。マグネ

シウムはまたポリメラーゼ結合を促進する役割を果たしていると思われる。翻訳を最適化するにはカリウムも同様に重要であるが、マグネシウムの場合とは違って、共役した転写と翻訳ではカリウムイオンの濃度は標準的な翻訳調製物量を経て変化させる必要はない。

カリウムとマグネシウムは標準的なウサギ網状赤血球溶解物中に存在している。その値は1部は内因性溶解物質によるものであり、そして1部は翻訳用溶解物に添加されるような溶解物の調製中になされた添加によるものである。溶解物は調製中に幾分希釈され、その結果転写と翻訳の共役反応では調製された溶解物は50%で使用されるにすぎない。

マグネシウム濃度はかなり狭い最適範囲内に調整すべきであるので、溶解物のマグネシウム値は、反応でのマグネシウム量が1つの溶解物バッチから次のバッチまで標準化できるように、追加のマグネシウムを添加する前にマグネシウムアッセイを使用して直接測定することが好ましい。ランサー (Lancer) の「マグネシウム ラピッド スタット ダイアグノスティック キット (Magnesium Rapid Stat Diagnostic Kit)」(Oxford Lab Ware Division, Sherwood Medical Co.、ミズーリー州セントルイス) は生物学的液体中のマグネシウム値を正確に測定できるそのような1つのアッセイである。溶解物の所定のバッチのマグネシウムイオン濃度が感知であると、溶解物のマグネシウム濃度を最適範囲内にするためにまたは反応混合物の半分として使用される標準溶解物調製物の場合には最適範囲の2倍以内にするため、例えば調製されたマグネシウム塩溶液形態の追加的なマグネシウムを既知の方法で添加することができる。

かくして、ウサギ網状赤血球溶解物の最終マグネシウム濃度を例え、塩化または酢酸マグネシウムの濃縮溶液を2.5mMより多いが3.5mM未満、好みしくは約3.0mMから3.5mMの間の濃度まで添加することによって調整すると、共役した転写と翻訳が生じることが見い出された。小麦胚芽抽出物を使用する転写と翻訳の共役化では、約3.0mMより多いが約5.25mM未満、好みしくは約4.0mMから4.75mMに調整された塩化または酢酸マグネシウムの最終濃度によってタンパク質が産生される。

転写と翻訳の共役反応の条件には、ウサギ網状赤血球溶解物ではリボヌクレオチド三リン酸 (ATP, GTP, CTP, UTP) およびアミノ酸をそれぞれ各

0.4mMおよび各20μMの最終濃度で添加することが含まれる。小麦胚芽抽出物の反応条件は、リボヌクレオチド三リン酸はCTPおよびGTPで0.4mM、GTPで0.5mMそしてATPで1.5mMの最終濃度になるように添加し、一方アミノ酸を20~80μMの最終濃度になるように添加することによって修正される。放射標識したアミノ酸、例えは35Sメチオニンまたは[3H]リオシンを共役反応に使用する場合には、対応するアミノ酸はアミノ酸混合物から除く。次いで、SP6、T7またはT3のいずれかのRNAポリメラーゼを、好みしくは50μlの反応物当たり約80~160ユニットの最終濃度になるように添加する。翻訳される遺伝子を育てるDNA複型は1μgの濃度で添加し、そして反応容器は水を添加して50μlに調整する。次いで、反応物は30°Cで1~2時間インキュベートする。

好みしい実施基準ではカリウムが反応混合物に添加されるが、マグネシウムとは対照的に追加的なカリウムはタンパク質産生を余り高めることではなく、通常なマグネシウム値が既に存在しているとき僅かな改善を提供するだけである。酢酸カリウムは約50mMの最終濃度になるように添加する。塩化または酢酸カリウムを添加できるが、マグネシウムの場合より多い量を添加するので、酢酸カリウムが好みしい。約50mMの濃度の標準的な翻訳溶解物を使用することができ、一方スペルミジンは約0.2mMの最終濃度を与えるように添加される。塩化または酢酸カリウムの最終濃度は標準的な溶解物中の当該成分の量に基づいて算出されるが、この濃度はマグネシウム濃度と同様内因性成分により僅かに変化することを認識しなければならない。

転写と翻訳の共役反応の効率または安定性を改善するため所望の追加成分を溶解物に添加することができる。転写と翻訳の共役反応への1つの通常の添加は継続時間の効率を高めるのに十分な量のポリアミンである。絶対にそうでなければならないわけではないが、共役した転写と翻訳では、混合物中で約0.2mMの最終濃度のスペルミジンが最適であり、その際この濃度でタンパク質産生の増加が観察される。ポリアミンも同様に最適のマグネシウム値に影響を与える、そしてこれは翻訳反応のマグネシウムの有効濃度を幾分低下させることができるのでその結果マグネシウム条件の最適化において、多分転写と翻訳の共役の最適マグネシウム値を最もかか

下させる役割を果たすように思われる。

インビトロ環境での最適マグネシウム濃度は他の条件および理由によって影響を受ける。例えば、リボヌクレオチド三リン酸濃度が上昇すると、リボヌクレオチド三リン酸が溶解物中のマグネシウムと会合するかまたはキレートを形成する傾向があるので、最適マグネシウム濃度が付随して上昇する。かくして、上記反応で記載したリボヌクレオチド三リン酸濃度が0.6mMに上昇するとき、転写と翻訳の共役反応から得られるタンパク質の産生は大いに低下する。マグネシウムの最終濃度はまた細胞溶解物のタイプによって、即ち小麦胚芽抽出物を使用するのかまたはウサギ網状赤血球を使用するのかによっても変化する。最適濃度を達成するために添加される必要なマグネシウム量は、溶解物の濃度が上昇すると溶解物それ自体からのマグネシウムの寄与も増加するので、反応混合物中で使用される溶解物の濃度により変化する。

溶解物混合物中には多数の成分があるため、最適な塩条件以外のもので悪い影響を受けるのはRNAからのタンパク質翻訳であるのか、DNAからRNAの転写であるのかまたはそれらの両方であるのかを確實に述べることはできない。検出可能なタンパク質が反応中に生成しないという観察はいずれの場合でも同じである。マグネシウム濃度を、多分ポリアミン濃度によって、少々調整しそしてリボヌクレオチド三リン酸濃度が問題となることを無視することによって、転写と翻訳の共役が観察されるが、これは比較的小さい範囲による場合だけである。

ジチオスレイトール (DTT) は好みしくは翻訳混合物に添加される。転写と翻訳の共役反応に加えるとき、DTTは好みしくは約1.4mMの最終濃度になるよう添加される。最適DTTは小麦胚芽では約5.1mMである。更に、RNasinのようないろいろなリボヌクレアーゼインヒビターは内因性リボヌクレアーゼを効果的に不活性化するために溶解物に添加することができる。反応物50μl当たり40単位の濃度が該反応の延長を助けることが証明されている。RNasinはウサギ網状赤血球溶解物中の転写と翻訳の共役には絶対的な要件ではないが、小麦胚芽抽出物を使用する転写と翻訳の共役では必要である。後者からRNasinを除くと、該溶解物中には活性のリボヌクレアーゼが存在しているので、タンパク質翻訳は生じ

ない。

ウサギ臍状赤血球溶解物での堆化若しくは酢酸カリウム、堆化若しくは酢酸マグネシウムおよびスペルミジンの好みしい共役反応濃度は $22.5\mu\text{l}$ の最終のトリス／酢酸緩衝液（1×T A緩衝液 $\times 33\text{ml}$ のトリス／酢酸 pH7.8、 $65\text{ml}$ の酢酸カリウム、 $10\text{ml}$ の酢酸マグネシウム、 $4\text{ml}$ のスペルミジン、 $1\text{ml}$ のDTT）を添加して達成することができる。標準的な $50\mu\text{l}$ のインビトロ翻訳反応物に上記緩衝液を添加するとき、この緩衝液は溶解物中のマグネシウム量を全体で $0.5\text{mM}$ 上昇させる。

ウサギ臍状赤血球溶解物は製造中に修正することができる。この溶解物は50%の濃度（典型的には、 $50\mu\text{l}$ の反応物当たり $25\mu\text{l}$ の溶解物）で使用されるので、好みしい修正は酢酸カリウム濃度を $11.8\text{mM}$ に、酢酸マグネシウム濃度を約 $5.2\text{mM}$ から約 $6.0\text{mM}$ に、そしてスペルミジン濃度を $0.4\text{mM}$ に調整することに保たれている。このことによって、50%溶解物を転写と翻訳の共役反応で使用するとき、 $59\text{ml}$ の酢酸カリウム、 $2.8\text{ml}$ から $3.0\text{ml}$ の酢酸マグネシウムおよび $0.2\text{ml}$ のスペルミジンの最終濃度が与えられる。この溶解物はRNAポリメラーゼ（SP6、T7またはT3）の1つを、好みしくは $50\mu\text{l}$ の反応物当たり $80\sim160$ 単位の濃度で溶解物に添加することによって更に修正することができる。このような溶解物は必要になるまで冷蔵保存することができる。

スペルミジンも好みしくは、最適には約 $0.9\text{mM}$ の最終濃度で小麦胚芽抽出物に添加される。酢酸カリウムは好みしくは約 $55.5\text{mM}$ の最終濃度まで添加される。これらの濃度は標準的な小麦胚芽抽出物中のこれら成分の量の算出に基づいているが、標準的な小麦胚芽抽出物を使用する $50\mu\text{l}$ のインビトロ翻訳に $5.0\mu\text{l}$ の1×T A緩衝液を添加することによって達成することができ、そして溶解物自体の内因性成分により僅かに変化させることができる。

小麦胚芽抽出物はまた、溶解物を50%の濃度で使用するとき、酢酸カリウム、酢酸マグネシウムおよびスペルミジンの最終濃度が小麦胚芽の上記反応条件で上記した濃度と同じであるように、製造工程で修正することもできる。小麦胚芽抽出物はRNAポリメラーゼの1つを1反応当たり $80\sim160$ 単位の最終濃度で添加することによって製造中に更に修正することができる。修正した抽出物は使用

されるまで冷蔵保存される。

マグネシウム濃度を標準的溶解物中に存在する量のままにすると、タンパク質の生成は生じない。反応混合物に1×T A緩衝液のマグネシウム以外の他の成分を全て添加するとタンパク質を生成しない反応が生じる。他方、過剰のマグネシウムを添加すると翻訳も停止する。例えば、ウサギ臍状赤血球溶解物を使用するが約 $3.5\text{mM}$ の最終マグネシウム濃度を有する同様な反応混合物では、タンパク質の翻訳も停止する。この上昇は多分、カリウムおよびスペルミジン濃度のような他のパラメーター、並びにRNAがタンパク質に翻訳されるための最適マグネシウム濃度を変化させることが知られているリボヌクレオチド三リン酸濃度に従って確かに変化する。

修正された小麦胚芽抽出物と修正されたウサギ臍状赤血球溶解物は両者共、転写と翻訳の共役反応の組み立てを促進するキットの部分として含まれることができ。このようなキットは、真核細胞溶解物が調製されそして使用の準備ができるので、研究者に対する利便性を改善する。ウサギ臍状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物に加えて上記キットには、DNA錠型を導入して転写と翻訳の共役を行うのに必要な成分、試薬（酵素を含む）および種類被を含めることができる。溶解物は標準化することができ、または塩濃度の調整が製造中に既に行われているか若しくは更には共役した転写と翻訳に必要な1つまたはそれ以上の成分、試薬または緩衝液も含められているタイプのものであることができる。

共役したインビトロでの転写と翻訳で產生されたタンパク質の量は種々の想定で測定することができる。1つの方法は、翻訳されている特別のタンパク質の活性を測定するアッセイの利用可能性に依存している。タンパク質活性を測定するアッセイの1例はテクニカル ピュレティン (Technical Bulletin) 097、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン、に記載されているルシフェラーゼアッセイ系である。これらのアッセイはインビトロでの転写と翻訳の共役反応から產生された標識的に活性のタンパク質の量を測定する。活性アッセイでは、不適当なタンパク質の折りたたみのためまたはタンパク質活性に必要な他の翻訳後修正がないため不活性である全長タンパク質は測定されない。

インビトロでの転写と翻訳の共役反応で產生されたタンパク質の量を測定する

もう1つの方法は既知量の $^{35}\text{S}$ メチオニンまたは $^{3}\text{H}$ ロイシンのような放射標識アミノ酸を使用しそして使い、新たに翻訳されたタンパク質を取り込まれた放射標識アミノ酸の量を測定して反応を行うことである。この方法の記載に関しては、ジ インビトロ トランスレーション テクニカル マニュアル (the *In vitro Translation Technical Manual*)、プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン参照。取り込みアッセイはインビトロ翻訳反応で產生された全タンパク質（切断されたタンパク質生成物を含む）中の放射標識アミノ酸の量を測定する。タンパク質ゲル上で放射標識タンパク質を分離し、そして生成物が過当な大きさであり且つ二次的タンパク質生成物が產生されていないことをオートラジオグラフィーで確認することが重要である。タンパク質產生の最も正確な測定は、活性測定を取込みの測定と間隔付けることである。

上記したように、転写と翻訳の共役反応にはDNA錠型の導入が必要である。インビトロでのタンパク質翻訳の異なる増強は多数のクローニング領域の1末端にポリア配列を含有するベクターを使用して達成されている。好みしいベクターはまた多数のクローニング領域の反対側末端にSP6、T7またはT3 RNAポリメラーゼプロモーターも含有しているので、ベクター中のクローニングは5'末端にRNAポリメラーゼプロモーターがそして3'末端にポリア配列が位置している遺伝子を生成させる。クローニングベクターは標準的なインビトロ転写反応に広く使用されるので、商業的に入手可能な多数のクローニングベクターは1つまたはそれ以上のプロモーターSP6、T7またはT3を含んでいる。ベクター $\circ$ SP64 (ポリア) はウィスコンシン州マディソンのプロメガコーポレーションから市販で入手可能である。このベクターはルシフェラーゼ遺伝子をクローニングするために使用され、該遺伝子は使いてウサギ臍状赤血球溶解物を使用する転写と翻訳の共役反応で翻訳された。同じルシフェラーゼ遺伝子はポリアを欠く別のベクター中にクローニングさせ、そして使いて転写と翻訳の共役反応で翻訳させた。活性アッセイをこれらの反応から得られた産生物で実験したとき、活性の限界の上界がポリア錠型物を含有する反応で明白であった。

タンパク質の同時翻訳および初期の翻訳後修正を研究するためには、転写と翻訳の共役反応はイヌ肺臍ミクロソーム膜の存在下で実施することができる。シゲ

ナルペプチド開裂、腫瘍注入、トランスロケーションおよびコアグリコシル化は研究できる修正の幾つかである。ミクロソーム膜の存在下で $\beta$ -ラクタマーゼブリカーゼのクローンを使用する転写と翻訳の共役反応は予期された形態のタンパク質を產生し、シグナルプロセッシングが生じていたことを示した。同様に、ミクロソーム膜の存在下でサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) から得られた $\alpha$ 因子のブリカーゼのクローンを使用する転写と翻訳の共役反応は所期のプロセッシングされた形態のタンパク質を產生し、グリコシル化を示した。

共役した転写と翻訳はタンパク質のインビトロ翻訳を必要とする任意の方法で使用することができる。これらの方法には、得られたタンパク質の構造および機能を研究するための遺伝子のインビトロ突然変異誘発が含まれる。他の方法は反応部位からタンパク質を単離するかまたは精製する目的での修正タンパク質のインビトロ翻訳である。ウサギ臍状赤血球溶解物または小麦胚芽抽出物における共役した転写と翻訳の方法は、これらの多くが余り時間を必要とせずして高い量のタンパク質を產生する点で、現行のインビトロ翻訳方法を超える利点を提供する。

このような評価した転写と翻訳の共役反応を使用することにはまた通常または複数反応を経る多数の利点がある。先ず第1に、2つの系の適用には主要な差異がある。通常系はタンパク質の大規模な工業的製造用であり、一方静置系反応は日常の研究者が現在行っているインビトロ翻訳に適する。通常の翻訳は実験がはるかにより高価であり、装置の投資（1つのAmicon unitには約2,000米ドルかかる）並びにかなりの量の試薬を必要とする。特に、通常の真核生物反応作業を行るために使用されるRNAポリメラーゼの値は簡単な研究用途には非常に高価なものである（20,000~30,000単位/反応）。通常の反応は比較的大量で行われるように設計されており、一方静置反応は反応容積が典型的には $50\mu\text{l}$ かまたはそれ未満のオーダーにすぎないので、余分の装置を必要とせず且つ少量の試薬しか必要でない。

通常の反応に必要な時間は24から100時間までのいずれかのかなりのものであり、一方静置反応には完結まで僅か1乃至2時間しか必要でない。研究者が現在実施しているインビトロ翻訳では、静置系はインビトロ翻訳技術を回避すること

## 特表平6-503477 (B)

によって大部分の分析または他の研究適用で時間のかなりの節約をもたらす。通常の反応の組み立ておよび実験の両方に時間が必要であるため、このような系では転写と翻訳が共役している最も典型的な研究者にとって正確時間は節約されない。更に、転写と翻訳の静置共役系では、RNA酵素を使用する標準的なインピトロ翻訳と比較してタンパク質産生の顕著な増加が確認される。DNA酵型が3'ポリA配列を有しているとき、タンパク質産生の更大的な増加が静置系で観察される。それ故、一般に、費用の有効性および使用の容易さのみならず他の要因の真核生物系を含む顕著な時間の節約およびタンパク質産生の増加のため、静置系は共役した転写と翻訳を日常の研究者に対し利用可能にする。

### 実施例1

共役した転写と翻訳をルシフェラーゼ遺伝子を有するDNA複合物で実験した。反応はルシフェラーゼアッセイ系（プロメガコーポレーション、ウィスコンシン州マディソン）を使用してルシフェラーゼ酵素の産生をアッセイした。ルシフェラーゼ活性はターナー（Turner）ルミノメーターを使用してターナー光単位で測定される。転写と翻訳の共役は次の反応条件下で達成させた：

25.0 μl	標準的なウサギ卵状赤血球溶解液
8.0 μl	rNTP (ATP, GTP, UTP, CTP) 各2.5mM
1.0 μl	SP6 RNA ポリメラーゼ (80単位/μl)
2.5 μl	1xTA緩衝液*
1.0 μl	RNasin (40単位/μl)
1.0 μl	pSP64ポリA/+ucDNA (1μg) 現状プラスミドDNA
1.0 μl	1mM アミノ酸 (完全)
9.5 μl	H <sub>2</sub> O
50.0 μl	

\* 1xTA緩衝液は33mMのトリス／酢酸、pH7.8、65mMの酢酸カリウム、10mMの酢酸マグネシウム、4mMのスペルミジンおよび1mMのDTTからなる。

この反応物は30°Cで1.5時間インキュベートした。1.5時間後、上記反応から得られた2.5 μlの試料は、適所に100倍の光フィルターを有するルミノメーター中でアッセイした。試料は5,000を超えるターナー光単位を生じさせた。

この共役に必要な他の成分（例えば、緩衝液やアミノ酸）は溶解物の製造中に添加できることが示された。添加された成分を有する溶解物は共役反応でタンパク質を産生させるためにDNA酵型を導入して使用することができる。

### 実施例4

種々のタンパク質の遺伝子を有するDNA複合物は転写と翻訳の共役反応で試験した。放射標識したアミノ酸（35Sメチオニン）を反応混合物に加えた以外は実施例1と同一の反応条件を使用した。メチオニンはアミノ酸混合物から除いた。反応はSP6またはT7 RNAポリメラーゼプロモーターの後でクローニングされたプラスミドDNA複合物を使用して実験した。ルシフェラーゼをコードするpGEM-LucプラスミドDNAを転写と翻訳の共役反応で使用し、そして放射標識したアミノ酸の15.3%の取り込みをもたらした。これを、転写されたルシフェラーゼクローニングのRNA酵型を使用する標準的なインピトロ翻訳（これは0.8%の取り込みをもたらした）と比較した。これらの反応から得られた試料はSDS/PAGEで実験して、タンパク質生物がルシフェラーゼの適当な大きさであったことが確認された。更なる実験はSP6プロモーターの後のβ-ラクタマーゼ遺伝子およびS. セレビシエのα因子のクローニングを使用して実験した。β-ラクタマーゼのRNA酵型を使用する標準的なインピトロ翻訳では確認されたアミノ酸の3.6%の取り込みをもたらし、一方DNA酵型を使用する転写と翻訳の共役反応では26.8%の取り込みをもたらした。α因子遺伝子のRNA酵型を使用する標準的なインピトロ翻訳では0.8%の取り込みをもたらしたが、一方DNA酵型を使用する転写と翻訳の共役反応では12.4%の取り込みをもたらした。更に、反応の試料は産生されたタンパク質の大きさを確認するためSDS/PAGEゲル上で洗浄した。転写と翻訳の共役反応でDNA酵型から得られた他のタンパク質には次のものがある：TFI ID転写因子、T7プロモーターの後、5%の取り込み；CJun転写因子、T7の後、13.4%の取り込み；β-ガラクトシダーゼ、SP6プロモーターの後、28%の取り込み；およびポリA/+uc、ポリAベクター中のルシフェラーゼ遺伝子、SP6の後、25.9%の取り込み。

### 実施例5

共役した転写と翻訳はイヌのミクロゾーム膜の存在下および不存在下でβ-ラ

クターマーゼブリカーサーのDNA複合物を使用してウサギ卵状赤血球溶解物で実験してタンパク質の転写後修正を試験した。これらの反応物はオートラジオグラフィーで蛋白質を視覚化するために標識アミノ酸を有していた。反応物から得られた蛋白質はSDS/PAGEゲル上で洗浄した。ミクロゾーム膜を有しない反応から得たタンパク質生物は約31.5キログルトン(Kd)で移動し、一方ミクロゾーム膜を有する反応から得たタンパク質生物は約28.9Kdで移動し、シグナル配列がプロセシングされたことを示した。

同様な転写と翻訳の共役実験で、S. セレビシエのα因子のDNA複合物はイヌのミクロゾーム膜の存在下および不存在下の両方で翻訳させた。更に、放射標識生物もゲル上で洗浄し、そしてその結果は、18.8Kdのブリカーサーが32.0Kdで移動するタンパク質にプロセシングされたことを示し、α因子がグリコシル化されたことを示した。

### 実施例6

共役した転写と翻訳は、熱帶環境幅方面から得たDNAで実験した。このようなDNAの唯一の要件は増幅されたフラグメントがRNAポリメラーゼプロモーターを有することである。実験はpGEM-Lucプラスミドから増幅されたDNAフラグメントを使用して実験した。得られたフラグメントはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターの配列およびルシフェラーゼ遺伝子の配列を有していた。このフラグメントを実施例1の条件下で共役反応に導入したとき、ルシフェラーゼタンパク質が産生された。T7プロモーターの後のpGEMEX/+遺伝子10フラグメント、およびSP6プロモーターの後のβ-ガラクトシダーゼフラグメントを含む増幅された他のDNAフラグメントを共役反応で翻訳させた。

本願明の1つの実験結果を記載したが、本明の精神または下記請求の範囲から離れることなく種々の変更および修正をなすことは当業者に明白であろう。

国際調査報告		International Application No. PCT/AU93/001												
<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>          PCT/CN93/001          US CL. 439/1.1</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to PCT patent classification and IPC</p> <p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Maximum documents searched (classification system designated by classification symbols)</p> <p>U.S. 439/1.1, 491, 37C.1</p> <p>Classification maintained after U.S. maximum documentation in the report that such documents are maintained on the date indicated</p> <p>Changes and date last conducted during the international search (date of last term and, where practicable, name of the next)</p> <p>DIALOG, EPRINT, MEDLINE, ARI, SEARCH POLARIS, COUPLED, TRANSLATION, TRANSCRIPTION, IN VITRO</p> <p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 10%;">Category</th> <th style="text-align: left; width: 60%;">Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; width: 30%;">Reference or class No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>1. P. A. YUSIFOV, ISLAMOV ET AL.; 21 FEBRUARY 1991. SEE ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>1-2, 4, 19-21, 23, 30, 33-40, 43-45, 50, 51-52, 59, 63, 67-70, <b>71-72, 82</b>, 84-21, 23-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>2. BIOTECH, VOLUME 12, ISSUED 1977. MIZUNO, "EFFECT OF KCL, MAGNESIUM ACETATE AND SODIUM ON THE RATIO OF A TO B OZONE CHAINS BY IR-RADIATION". PAGES 351-360. SEE ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>3-4, 22-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>3. VIROLOGY VOLUME 75, ISSUED 1976. BERTHOL ET AL., "STUDIES ON THE IN VITRO DISSECTION AND TRANSLATION OF VESicular STOMATitis VIRUS mRNA". PAGES 106-116. SEE ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>1-43</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> One page study notes.</p> <p>*1: General expression of the documents.      *2: Document which is present now or will be on request.      *3: Document which is present now or will be on request after payment of a fee.      *4: Document which is present now or will be on request after payment of a fee and which is not available for examination.      *5: Document which does not contain any secret matter or which is not available for examination.      *6: Document which does not contain any secret matter or which is not available for examination.      *7: Document which does not contain any secret matter or which is not available for examination.      *8: Document which does not contain any secret matter or which is not available for examination.</p> <p>Date of the initial completion of the international search</p> <p>06 August 1993</p> <p>Date of mailing of the international search report</p> <p>12 JAN 1993</p> <p>Name and mailing address of the ISA/ Commission of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20531</p> <p>Authorized officer</p> <p>DAVID B. SCHWEICKER</p> <p>Telephone No. (703) 208-5102</p> <p>Fax No. PCT/ISA/210 Received August 06, 1992</p>			Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages	Reference or class No.	X	1. P. A. YUSIFOV, ISLAMOV ET AL.; 21 FEBRUARY 1991. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-2, 4, 19-21, 23, 30, 33-40, 43-45, 50, 51-52, 59, 63, 67-70, <b>71-72, 82</b> , 84-21, 23-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83	Y	2. BIOTECH, VOLUME 12, ISSUED 1977. MIZUNO, "EFFECT OF KCL, MAGNESIUM ACETATE AND SODIUM ON THE RATIO OF A TO B OZONE CHAINS BY IR-RADIATION". PAGES 351-360. SEE ENTIRE DOCUMENT.	3-4, 22-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83	Y	3. VIROLOGY VOLUME 75, ISSUED 1976. BERTHOL ET AL., "STUDIES ON THE IN VITRO DISSECTION AND TRANSLATION OF VESicular STOMATitis VIRUS mRNA". PAGES 106-116. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43
Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages	Reference or class No.												
X	1. P. A. YUSIFOV, ISLAMOV ET AL.; 21 FEBRUARY 1991. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-2, 4, 19-21, 23, 30, 33-40, 43-45, 50, 51-52, 59, 63, 67-70, <b>71-72, 82</b> , 84-21, 23-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83												
Y	2. BIOTECH, VOLUME 12, ISSUED 1977. MIZUNO, "EFFECT OF KCL, MAGNESIUM ACETATE AND SODIUM ON THE RATIO OF A TO B OZONE CHAINS BY IR-RADIATION". PAGES 351-360. SEE ENTIRE DOCUMENT.	3-4, 22-24, 41, 49, 51-52, 66, 68-69, 82-83												
Y	3. VIROLOGY VOLUME 75, ISSUED 1976. BERTHOL ET AL., "STUDIES ON THE IN VITRO DISSECTION AND TRANSLATION OF VESicular STOMATitis VIRUS mRNA". PAGES 106-116. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43												

国際調査報告		International Application No. PCT/AU93/001															
<p><b>C. (Continued). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 10%;">Category</th> <th style="text-align: left; width: 60%;">Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; width: 30%;">Reference or class No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>4. BIOC. NATL. ACAD. SCI. USA, VOLUME 80, NO. 8, RELEASED AUGUST 1983, BERNSTEIN, "SYNTHETIC TRANSLATOR OF TOBACCO MOSAIC VIRUS RNA AND RABBIT GLYCOP 15 RNA IN A CELL-FREE SYSTEM FROM COMMERCIAL WHEAT GERM". PAGES 328-334. SEE ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SCIENCE, VOLUME 242, ISSUED 12 NOVEMBER 1990, SPERDI ET AL., "A CONTINUOUS CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM CAPABLE OF PRODUCING POLYPEPTIDES IN HIGH YIELD". PAGES 1167-1168. SEE ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NUCLEIC ACIDS RES., VOLUME 17, NUMBER 11, ISSUED JUNE 1989, SYARSOVA ET AL., "PREPARATIVE SYNTHESIS IN A CONTINUOUS CELL-FREE SYSTEM FROM BABY RETICULOCYTES" PAGE 4411. SEE FIGURE 1.</td> <td>1-43</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GENE, VOLUME 14, ISSUED 1990, SARANOV ET AL., "GENE EXPRESSION IN A CELL-FREE SYSTEM ON THE PREPARATIVE SCALE". PAGES 463-468. SEE FIGURE 1. AND ENTIRE DOCUMENT.</td> <td>1-43</td> </tr> </tbody> </table> <p>Form PCT/ISA/210 (continuation of record sheet 1/July 1992)</p>			Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages	Reference or class No.	X	4. BIOC. NATL. ACAD. SCI. USA, VOLUME 80, NO. 8, RELEASED AUGUST 1983, BERNSTEIN, "SYNTHETIC TRANSLATOR OF TOBACCO MOSAIC VIRUS RNA AND RABBIT GLYCOP 15 RNA IN A CELL-FREE SYSTEM FROM COMMERCIAL WHEAT GERM". PAGES 328-334. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43	Y	SCIENCE, VOLUME 242, ISSUED 12 NOVEMBER 1990, SPERDI ET AL., "A CONTINUOUS CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM CAPABLE OF PRODUCING POLYPEPTIDES IN HIGH YIELD". PAGES 1167-1168. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43	Y	NUCLEIC ACIDS RES., VOLUME 17, NUMBER 11, ISSUED JUNE 1989, SYARSOVA ET AL., "PREPARATIVE SYNTHESIS IN A CONTINUOUS CELL-FREE SYSTEM FROM BABY RETICULOCYTES" PAGE 4411. SEE FIGURE 1.	1-43	Y	GENE, VOLUME 14, ISSUED 1990, SARANOV ET AL., "GENE EXPRESSION IN A CELL-FREE SYSTEM ON THE PREPARATIVE SCALE". PAGES 463-468. SEE FIGURE 1. AND ENTIRE DOCUMENT.	1-43
Category	Character of document, with reference, where appropriate, of the relevant passages	Reference or class No.															
X	4. BIOC. NATL. ACAD. SCI. USA, VOLUME 80, NO. 8, RELEASED AUGUST 1983, BERNSTEIN, "SYNTHETIC TRANSLATOR OF TOBACCO MOSAIC VIRUS RNA AND RABBIT GLYCOP 15 RNA IN A CELL-FREE SYSTEM FROM COMMERCIAL WHEAT GERM". PAGES 328-334. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43															
Y	SCIENCE, VOLUME 242, ISSUED 12 NOVEMBER 1990, SPERDI ET AL., "A CONTINUOUS CELL-FREE TRANSLATION SYSTEM CAPABLE OF PRODUCING POLYPEPTIDES IN HIGH YIELD". PAGES 1167-1168. SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-43															
Y	NUCLEIC ACIDS RES., VOLUME 17, NUMBER 11, ISSUED JUNE 1989, SYARSOVA ET AL., "PREPARATIVE SYNTHESIS IN A CONTINUOUS CELL-FREE SYSTEM FROM BABY RETICULOCYTES" PAGE 4411. SEE FIGURE 1.	1-43															
Y	GENE, VOLUME 14, ISSUED 1990, SARANOV ET AL., "GENE EXPRESSION IN A CELL-FREE SYSTEM ON THE PREPARATIVE SCALE". PAGES 463-468. SEE FIGURE 1. AND ENTIRE DOCUMENT.	1-43															